

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591014710]

1. 変更年月日	1992年 9月 4日
[変更理由]	住所変更
住 所	千葉県千葉市中央区市場町1番1号
氏 名	千葉県

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591014710]

1. 変更年月日 1993年 7月16日
- [変更理由] 識別番号の二重登録による統合
- [統合元識別番号] 592077671
- 住 所 千葉県千葉市中央区市場町1番1号
- 氏 名 千葉県

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 2 0 7 7 6 7 1 ]

1. 変更年月日 1 9 9 2 年 7 月 3 日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号  
氏 名 千葉県
2. 変更年月日 1 9 9 3 年 7 月 1 6 日  
[変更理由] 識別番号の統合による抹消  
[統合先識別番号] 5 9 1 0 1 4 7 1 0  
住 所 千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号  
氏 名 千葉県

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000160522]

1. 変更年月日	1990年 9月13日
[変更理由]	新規登録
住 所	佐賀県鳥栖市田代大官町408番地
氏 名	久光製薬株式会社

## 認定・付加情報

特許出願の番号	平成 11 年 特許願 第 245962 号
受付番号	59900844735
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成 11 年 9 月 3 日

### <認定情報・付加情報>

#### 【特許出願人】

【識別番号】	000160522
【住所又は居所】	佐賀県鳥栖市田代大官町 408 番地
【氏名又は名称】	久光製薬株式会社

#### 【特許出願人】

【識別番号】	591014710
【住所又は居所】	千葉県千葉市中央区市場町 1 番 1 号
【氏名又は名称】	千葉県

#### 【代理人】

【識別番号】	申請人
【住所又は居所】	100088155
【氏名又は名称】	東京都中央区銀座二丁目 6 番 12 号 大倉本館 創英国際特許法律事務所
【氏名又は名称】	長谷川 芳樹

#### 【選任した代理人】

【識別番号】	100107191
【住所又は居所】	東京都中央区銀座二丁目 6 番 12 号 大倉本館 創英国際特許法律事務所
【氏名又は名称】	長濱 範明

【書類名】 要約書

【要約】

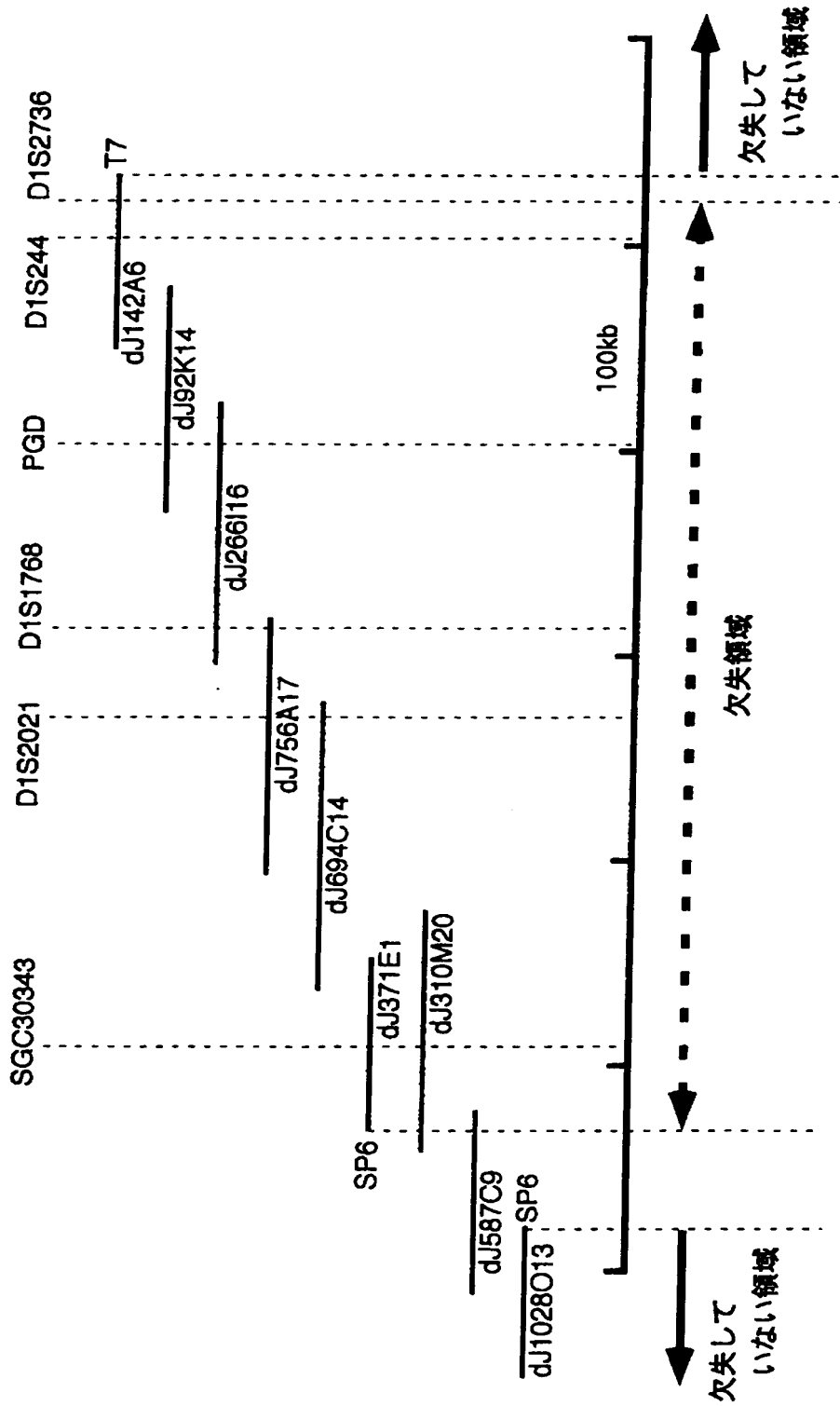
【課題】 神経芽細胞腫の癌抑制遺伝子を提供する。

【解決手段】 ヒト神経芽細胞腫の細胞株である NB-1、MASS-NB-S  
CH-1 における第 1 番染色体短腕 36 位の欠失領域を見いだした。

【選択図】 図 8

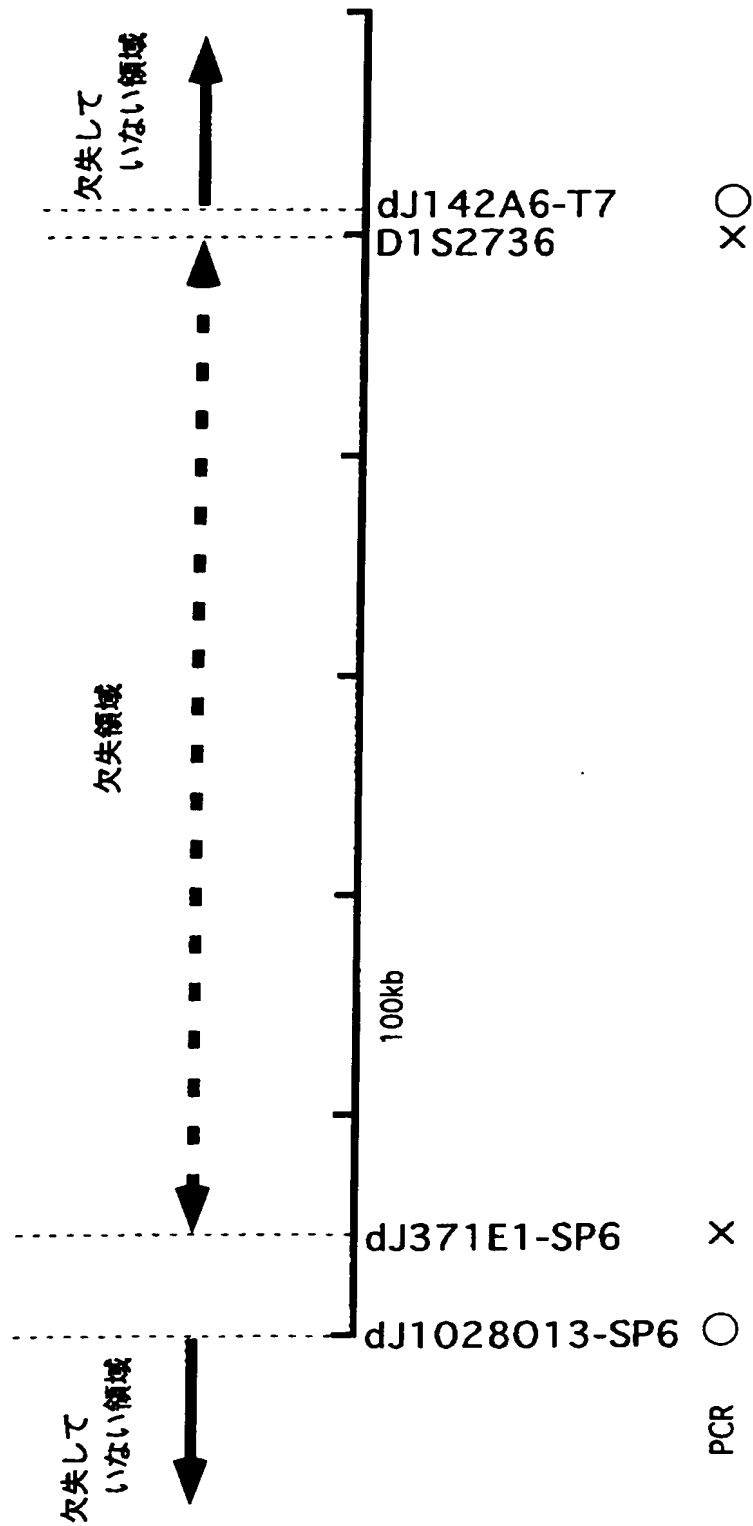
【図 8】

図 8 : 欠失領域を網羅する PAC クローン



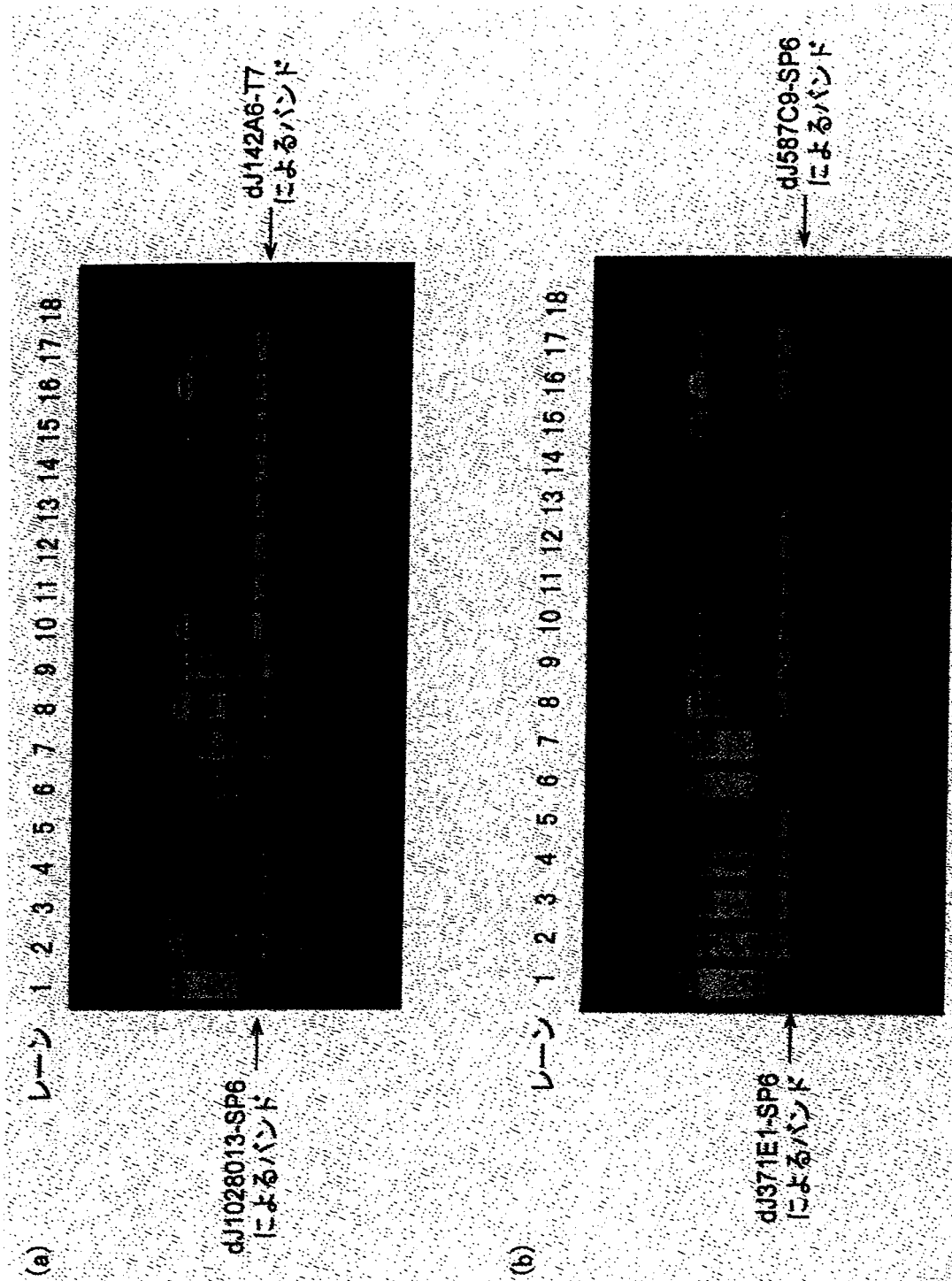
【図 7】

図 7 : 欠失領域の限定



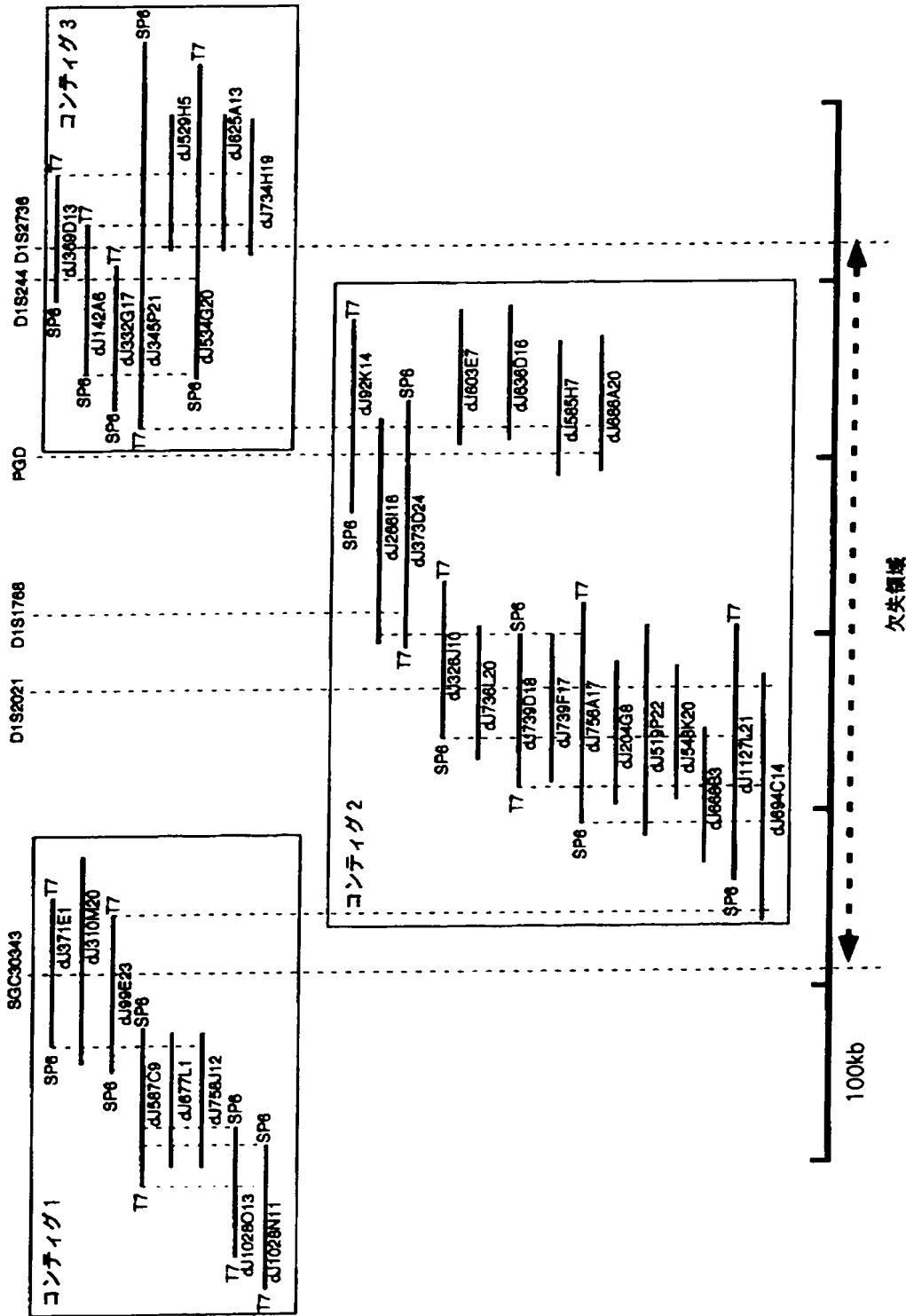


【図 6】



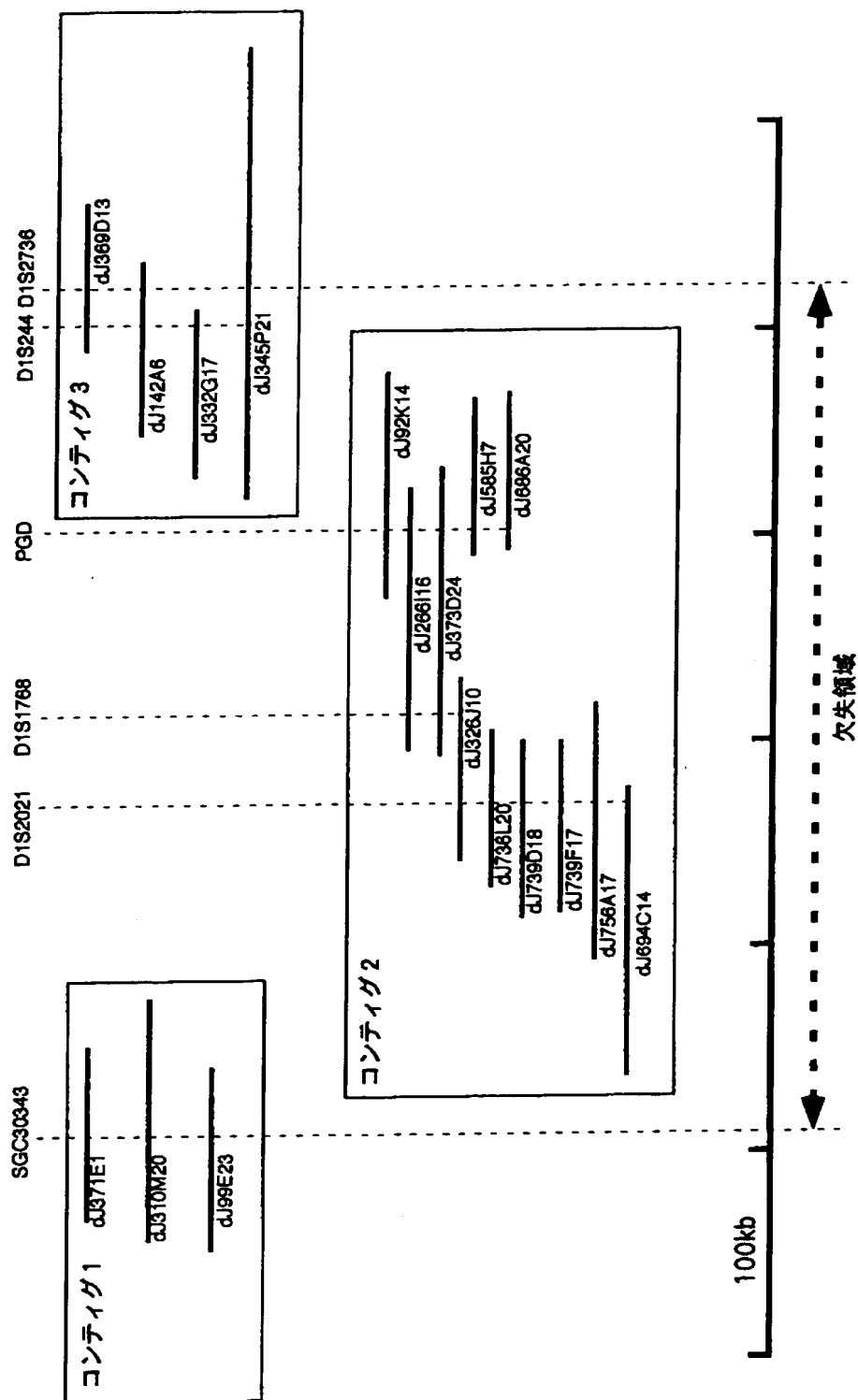
【図 5】

図 5 : 最終的に得られた 3 4 の PAC クローンとコンティング

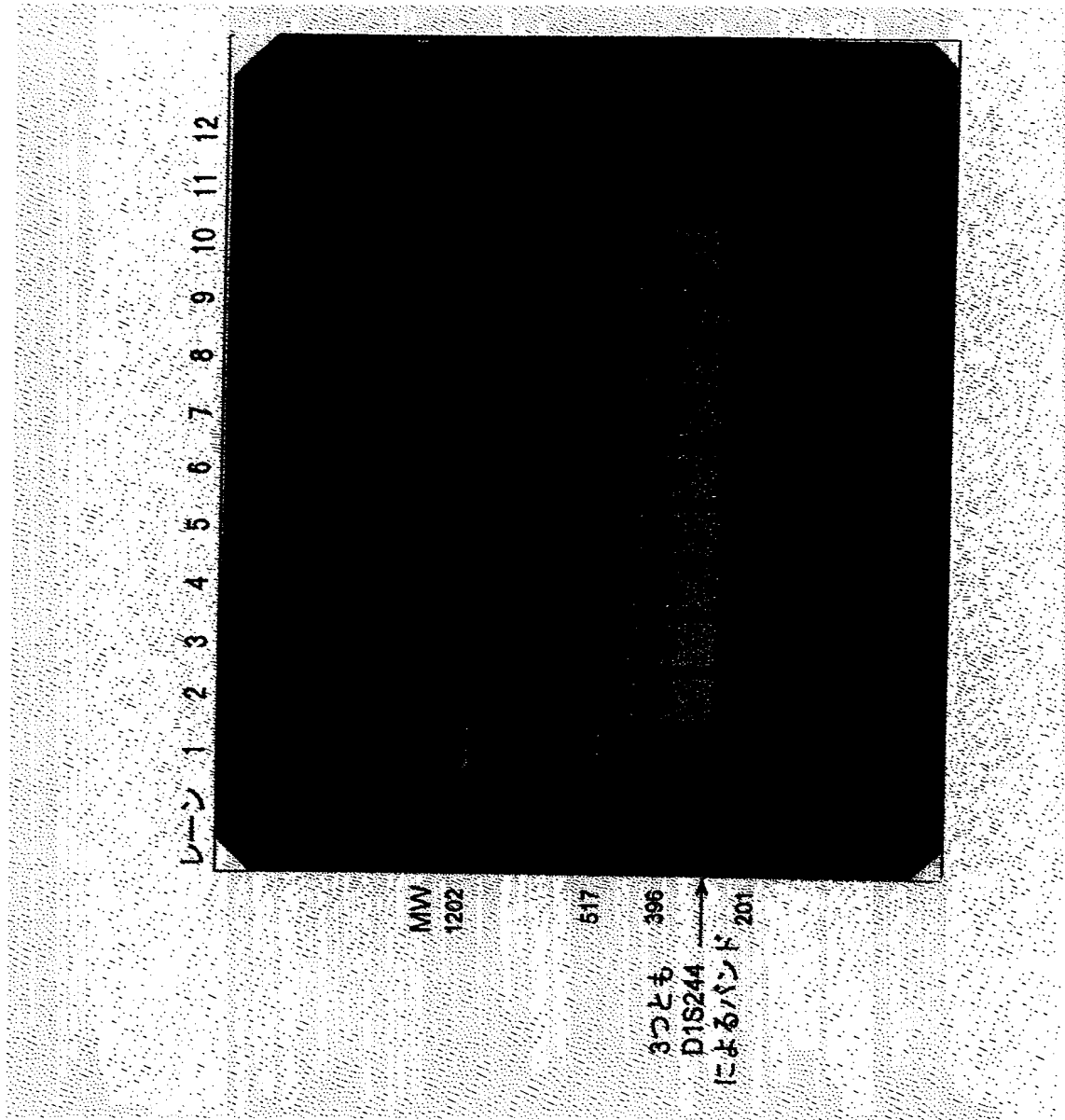


【図 4】

図 4 : 1 s t スクリーニングによって得られた 1 8 の P A C クローンとコンティグ

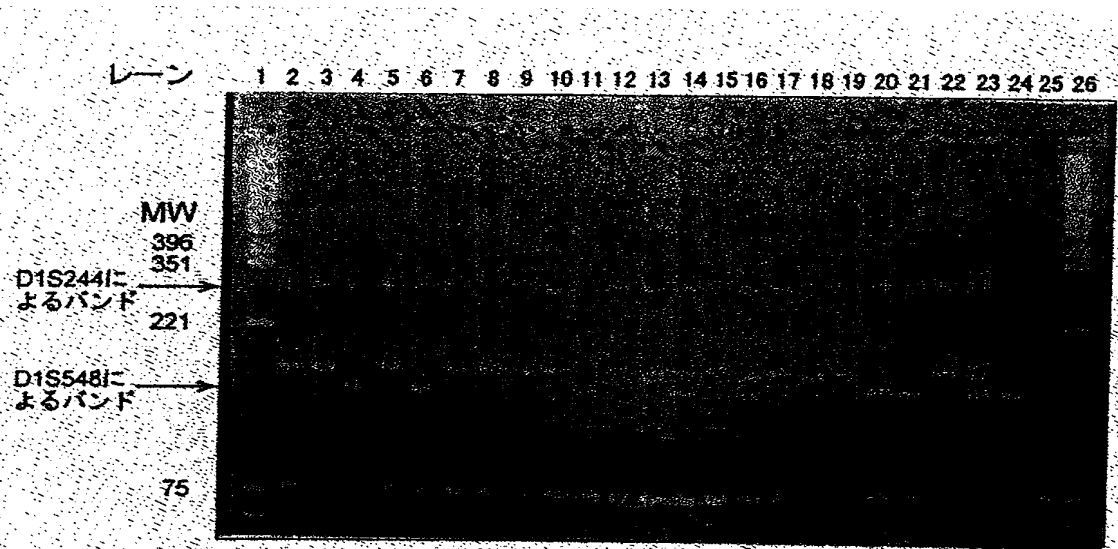


【図 3】

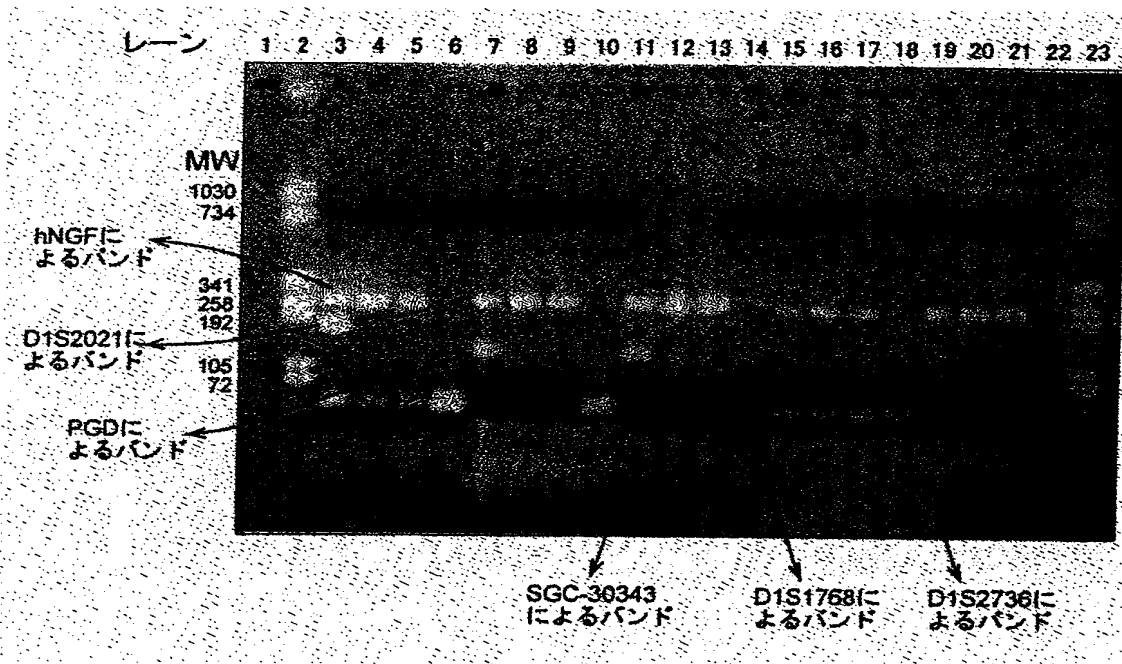


【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【図 7】 図 7 は本発明により明らかとなった 1 p 3 6 部位におけるゲノム欠失範囲を示す図である。

【図 8】 図 8 は本発明により明らかとなった 1 p 3 6 部位におけるゲノム欠失部位範囲に含まれる最小限の P A C クローンの位置を示す図である。

て見いだされた 1 p 3 6 部に含まれる P A C 3 4 クローンのコンティグを示す図である。

【図 6】 図 6 は P A C クローンの情報を元に設計したプライマーを用いた N B - 1、M A S S - N B - S C H - 1 ゲノム DNA に対する P C R 反応物の電気泳動写真である。ゲルは 2. 5 % アガロースを用いた。ここで、各レーンは以下のとおりである。

レーン 1 : マーカー ( 1 2 0 2 b p、5 1 7 b p、3 9 6 b p、2 0 1 b p )

レーン 2 : 陽性対照 ( ヒト胎盤 DNA )

レーン 3 : 1 p 3 6 部位に欠損を有さない神経芽細胞腫患者由来の正常細胞

レーン 4 : 1 p 3 6 部位に欠損を有さない神経芽細胞腫患者由来の癌細胞

レーン 5 : M A S S - N B - S C H - 1 患者由来の正常細胞

レーン 6 : M A S S - N B - S C H - 1

レーン 7 : N B 1

レーン 8 : 陽性対照 ( ヒト染色体を有するマウスハイブリドーマ )

レーン 9 : 陽性対照 ( ヒトリンパ球 )

レーン 1 0 : 陽性対照 ( ヒト胎盤 DNA )

レーン 1 1 : 1 p 3 6 部位に欠損を有さない神経芽細胞腫患者由来の正常細胞

レーン 1 2 : 1 p 3 6 部位に欠損を有さない神経芽細胞腫患者由来の癌細胞

レーン 1 3 : M A S S - N B - S C H - 1 患者由来の正常細胞

レーン 1 4 : M A S S - N B - S C H - 1

レーン 1 5 : N B 1

レーン 1 6 : 陽性対照 ( ヒト染色体を有するマウスハイブリドーマ )

レーン 1 7 : 陽性対照 ( ヒトリンパ球 )

レーン 1 8 : 空レーン。

また、( a ) においては、レーン 1 ~ 8 はプライマーとして d J 1 0 2 8 O 1 3 - S P 6 を使い、レーン 9 ~ 1 7 はプライマーとして d J 1 4 2 A 6 - T 7 を用いた。( b ) においては、レーン 1 ~ 8 はプライマーとして d J 3 7 1 E 1 - S P 6 を使い、レーン 9 ~ 1 7 はプライマーとして d J 5 8 7 C 9 - S P 6 を用いた。

）である。

【図2】 図2はD1S2021、PGD、SGC-30343、D1S1768、D1S2736プライマーセットを用いたNB-1、MASS-NB-SCH-1ゲノムDNAに対するPCR反応物の2%アガロースゲルによる電気泳動写真である。なお全てのPCR反応物は陽性対照としてヒト神経増殖因子（human Neuro Growth Factor  $\beta$ : hNGF $\beta$ ）領域を特異的に増幅するプライマーを含んでいる。ここで、レーン1：空レーン、レーン2：分子量マーカー（上から1030, 734, 341, 258, 192, 105, 78, 75, 46, 36, 18, 17, 12, 11, 8bp）、レーン3：陽性対照（SY5Y）、レーン4：NB-1、レーン5：MASS-NB-SCH-1、レーン6：陰性対照（滅菌蒸留水）、レーン7：陽性対照（SY5Y）、レーン8：NB-1、レーン9：MASS-NB-SCH-1、レーン10：陰性対照（滅菌蒸留水）、レーン11：陽性対照（SY5Y）、レーン12：NB-1、レーン13：MASS-NB-SCH-1、レーン14：陰性対照（滅菌蒸留水）、レーン15：陽性対照（SY5Y）、レーン16：NB-1、レーン17：MASS-NB-SCH-1、レーン18：陰性対照（滅菌蒸留水）、レーン19：陽性対照（SY5Y）、レーン20：NB-1、レーン21：MASS-NB-SCH-1、レーン22：陰性対照（滅菌蒸留水）、レーン23：分子量マーカー（レーン2と同一）である。

【図3】 図3はD1S244プライマーセットを用いたPACのクローンDNAに対するPCR反応物の5%アクリルアミドによる電気泳動写真である。ここで、レーン1：分子量マーカー（1202bp、517bp、396bp、201bp）、レーン2～4：dJ142A6、レーン5～7：dJ332G17、レーン8～10：dJ369D13、レーン11：陽性対照（ヒト胎盤DNA）、レーン12：陰性対照（滅菌蒸留水）である。

【図4】 図4は1stスクリーニングによりNB-1、MASS-NB-SCH-1株において見いだされた1p36部に含まれるPAC18クローンのコンティグ図である。

【図5】 図5は最終的にNB-1、MASS-NB-SCH-1株におい



<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

tttttgaggt gtagagcag

20

# 【発明の効果】

以上本発明によりヒト神経芽細胞腫の第1番染色体短腕36位（以下1p36とする）に共通に存在するホモ接合性欠失（Homozygous Deletion）領域を同定した。得られた領域の塩基配列の情報に基づき、腫瘍の診断、予後同定の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカーを設計することを可能とし、さらに、該領域の塩基配列に基づき、腫瘍の遺伝子診断方法、抗癌剤の開発、腫瘍病体メカニズムの解析方法、腫瘍病体メカニズムの解析に用いる試薬の開発を可能とする。

# 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はD1S548、D1S244プライマーセットを用いたヒト神経芽細胞腫ゲノムDNAに対するPCR反応物の4%アガロースゲルによる電気泳動写真である。ここで、レーン1：分子量マーカー（上から1330, 828, 750, 696, 536, 517, 501, 396, 351, 221, 75, 65, 35, 22bp）、レーン2：SK-N-BE、レーン3：SK-N-DZ、レーン4：RT-BM1、レーン5：NLF、レーン6：LA-N-5、レーン7：IMR32、レーン8：NMB、レーン9：OAN、レーン10：NGP、レーン11：NB1、レーン12：CHP134、レーン13：KCN、レーン14：NBL-S、レーン15：CHP901、レーン16：SY5Y、レーン17：GANB、レーン18：SK-N-AS、レーン19：KAN、レーン20：LHN、レーン21：SAN、レーン22：TGW、レーン23：陽性対照（ヒトリンパ球）、レーン24：MASS-NB-SCH-1、レーン25：陰性対照（滅菌蒸留水）、レーン26：分子量マーカー（レーン1と同一

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

tttcctgcgt gtggcctc

18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

ttttccgtct ttccacac

18

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

tttttgaggt gtgagagcag

20

<210> 43

<400> 36

gtgttcctca tatggtca

18

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 37

tgggagtatg tctgccgg

18

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 38

ttccagttga tcagagtgcg

20

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 39

ttgaccgtgt ttgtcactta aa

22

<220>

<223> PCR primer

<400> 33

tggttttagag gcttttgc

18

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 34

tagctgaagc aatctatt

18

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 35

tctggacgta ctctgttc

18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 30

gtgaagagcc agagatgtcc

20

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

gtgactgcgt gattgcat

18

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 32

gtgttgagg ccaaattgtg

19

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

**gaggactagt gtcagaaa**

18

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 28

**gcctctttgt tgcagtgatt**

20

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 29

**gcgttaggaa ttgaacag**

18

<210> 30

<211> 20

ctgggcaagc taattttg

18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 24

ctgggcaagc taattttg

18

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 25

gaactcattg gcaaaaggaa

20

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 26

gagcagcacc gtacaaat

18

<223> PCR primer

<400> 20

ctcaatactg gatctgtg

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

ctgcttcgga ggtagcc

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

ctgcttcgga ggtagcc

18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 23



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

ccctcaccca cacttcac

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 18

cctccagggt attcttgg

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 19

cggccttaaa atctgata

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

atgaatggga caaacttc

18

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

catagtgcc acacgcaaag

20

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

ccacctccaa atcctgac

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

atacataaga taagaatc

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

atattgcaga ctgaacag

18

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

atctgatgtt tggagcttga g

21

<210> 14

<400> 7

agctccgctc cctgtaat

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

agtagacacg ggtatcag

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

agtatgctgt gtgtccag

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

agtatggcag acttgatg

18

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

accaggagct gctcatgtg

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

actaacagct ccgtgacgc

19

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

acttggagga tttatttg

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

aaacccctct tcttagagtg acg

23

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

aaacctcagc agtggtcctg

20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

aagcagtttt ccccataa

18

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

64-1368 (1992), Nakagawara A. 等 N. Engl. J. Med. 328, 847-854 (1993))

実際、小児神経芽細胞腫の患者157症例で1p36部におけるのLOH有無をtrk遺伝子の発現の強度と比較して調べたところ、1p36のLOH存在する患者42症例中trk高発現の患者が24例、低発現の患者は18例となった。逆に1p36のLOH存在しない患者では115例中trk高発現の患者が36症例、低発現の患者は79例となった。1p36のLOHの有無とtrk発現の間に良い相関が得られた。

#### 【0069】

同様に、発症年齢が高い患者(Nakagawara A. 等 Med. Pediatr. Oncol. 31, 113-115 (1998))、原発巣が副腎である患者(Nakagawara A. 等 Surgery 104, 34-40 (1988))、及び癌遺伝子であるN-mycが高発現している患者も(Brodeur GM. 等 Science 224, 1121-1124 (1984))も一般的に予後不良であるといわれているが、1p36のLOHの有無との相関が非常に安定して得られた。

#### 【0070】

以上のことから1p36のLOHの有無が予後と同定する優れたマーカーであることが明らかになった。

#### 【0071】

##### 【配列表】

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Human 1p36 Homozygous Deletion Region

<130> P99HM-010

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 23

小児神経芽細胞腫の患者の細胞を用い、今回明らかになった 1 p 3 6 部における LOH 有無と癌の予後に関する種々のファクターとの相関を検討し、その結果を表 7 に示した。

【0067】

【表 7】

表 7 : 1p36 部の LOH を用いたヒト神経芽細胞腫の予後の同定

(a) 患者の年齢との相関 :  $p=0.008$

	LOH 有り	LOH 無し	計
1 歳未満	23	103	126
1 歳以上	27	51	78
計	50	154	204

(b) 原発巣との相関 :  $p=0.000$

	LOH 有り	LOH 無し	計
副腎	42	81	123
副腎以外	8	78	85
計	50	159	209

(c) trkA 発現レベルとの相関 :  $p=0.003$

	LOH 有り	LOH 無し	計
trkA 高発現	24	36	60
trkA 低発現	18	79	97
計	42	115	157

(d) N-myc の有無との相関 :  $p=0.000$

	LOH 有り	LOH 無し	計
N-myc 有り	17	3	180
N-myc 無し	31	149	20
計	48	152	200

【0068】

一般的に癌遺伝子である trkA が高発現している患者は予後が不良とされている。(Nakagawara A. 等 Cancer Res. 52, 13



【表 6】

表 6 : D1S2736、dJ1028013-SP6、dJ371E1-SP6、dJ142A6-T7のシーケンス

プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3' (配列番号)	シーケンス(R) 5'-3' (配列番号)
D1S2736	CCTCCAGGGTATTCTTGG (18)	TTTTGAGGTGTGAGAGCAG (43)
dJ1028013-SP6	GTGTTCCCTCATATGTCA (36)	TGGTTTAGAGGCTTTTGC (33)
dJ371E1-SP6	CTGCTTCGGAGGTCAGCC (22)	GTGACTGCGTGATTGCAT (31)
dJ142A6-T7	CTGGCAAGCTAATTTTG (24)	TCTGGACGTACTCTGTTT (35)

【0066】

(実施例 7) 欠失領域に含まれる塩基配列に基づく、ヒト神経芽細胞腫の予後に関する診断

ンである d J 1 4 2 A 6 の T 7 側プライマーセットの間で規定される 1 p 3 6 部位におけるゲノム欠失領域の範囲が得られた。

【 0 0 6 3 】

この欠失領域を全て網羅する最小限の P A C クローンを図 8 に示す。この P A C クローンのシーケンスを決定することで N B - 1、M A S S - N B - S C H - 1 の欠失領域中に含まれる塩基配列が決定する。

【 0 0 6 4 】

なお、表 6 は本発明により明らかとなった 1 p 3 6 部位におけるゲノム欠失部位範囲を決定したプライマーセットのシーケンスを示す表である。

【 0 0 6 5 】

られた。得られた結果を図 5 に示す。

#### 【0058】

(実施例 6) NB-1 及び MASS-NB-SCH-1 株の 1 p 3 6 部位におけるゲノム欠失部位の特定

実施例 4 により、NB-1 及び MASS-NB-SCH-1 は 1 p 3 6 部位の少なくとも SGC-30343 から D1S2736 で規定される領域に両染色体の欠失を有するものと判断したが、欠失領域の両末端を特定するために以下の操作を行った。

#### 【0059】

実施例 5 により得られた PAC クローンによるコンティグ情報から欠失領域付近に新たにプライマーを合成し、NB-1 及び MASS-NB-SCH-1 株と陽性コントロールの PCR を以下の条件で行い、特異的バンドの増幅の有無を調べた。LA PCR kit (宝酒造社製) を用いて以下の方法で PCR を行った。

#### 【0060】

1  $\mu$  l のゲノム DNA 溶液 (100 ng/ $\mu$  l)、1  $\mu$  l の 10x LA PCR buffer、0.6  $\mu$  l の dNTPs (2.5 mM: キット付属品)、0.1  $\mu$  l のプライマー F (100 mM)、0.1  $\mu$  l のプライマー R (100 mM)、7.15  $\mu$  l の滅菌蒸留水、および 0.05  $\mu$  l の LA Taq (5 u/ $\mu$  l: キット付属品) を混合し 10  $\mu$  l の混合液を調整した。混合液を 95℃ で 2 分間変性させた後、95℃ で 30 秒間、58℃ で 1 分間を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返し PCR 反応を行った。

#### 【0061】

この PCR 反応物を 2.5% のアガロースゲルを用いて電気泳動した。得られた結果を図 6 に示す。

#### 【0062】

これらの結果により、図 7 に示すような PAC クローンである dJ1028013 の SP6 側プライマーセットと PAC クローンである dJ371E1 の SP6 側プライマーセットの間からプライマーセット D1S2736 と PAC クロー

【表 5】

表 5 : 2nd、3rdスクリーニングにより得られたPACクローン  
太字は複数のプライマーにより検出されたクローン

2nd		
プライマーセット	新たに得られたPACクローン	コンティグ
dJ99E23-T7	dJ694C14	1
dJ371E1-SP6	dJ587C9、dJ677L1、dJ758J12	
dJ326J10-SP6	dJ204G8、dJ519P22、dJ548K20、dJ668B3、dJ1127L21、dJ694C14	2
dJ739D18-SP6	-	
dJ756A17-SP6	dJ519P22、dJ668B3、dJ1127L21	3
dJ373D24-SP6	dJ332G17、dJ345P21、dJ603E7、dJ636D16、dJ585H7、dJ686A20	
dJ369D13-T7	dJ529H5、dJ534G20、dJ625A13、dJ734H19	
dJ142A6-SP6	-	
dJ142A6-T7	dJ534G20	
dJ345P21-T7	dJ603E7、dJ636D16	
3rd		
プライマーセット	新たに得られたPACクローン	コンティグ
dJ587C9-T7	dJ1028O13、dJ1028N11	1

【0057】

2nd、3rdスクリーニングに用いたウォーキングプライマーのシークエンスを表4に示す。最終的に34クロンのPACからなる1つのコンティグが得

新たに設計したプライマーセットを用いて再度 P A C DNA pool から P C R による P A C クローンを選抜し、同様に、選抜されたクローンの両末端シーケンスによるウォーキングプライマーの設計、ウォーキングによるコンティグの決定のプロセスを繰り返した。これを 2 n d、3 r d スクリーニングとした。表 5 に選抜したクローンとそれぞれのプライマーセットの塩基配列を示した。

【 0 0 5 6 】

【表 4】

表 4 : 2nd、3rdスクリーニングで使用したプライマーセットのシーケンス

2nd

コンティグ	PACクローン	プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3'	(配列番号)	シーケンス(R) 5'-3'	(配列番号)
1	dJ99E23	dJ99E23-T7	GGTTAGGAATTGAACAG	(2 9)	TGGGAGTATGCTGCCGG	(3 7)
	dJ371E1	dJ371E1-SP6	CTGCTTCGGAGGTCAGCC	(2 1)	GTGACTGCGTGATTGCAT	(3 1)
2	dJ326J10	dJ326J10-SP6	ACTTGGAGGATTTATTG	(6)	ATACATAAGATAAGAATC	(1 1)
	dJ739D18	dJ739D18-SP6	TAGCTGAAGCAATCTATT	(3 4)	TTTTCCGTCCTTCCACAC	(4 1)
	dJ756A17	dJ756A17-SP6	AGTATGCTGTGTGCCAG	(9)	GAGGACTAGTGTGAGAAA	(2 7)
	dJ373D24	dJ373D24-SP6	AGTAGACACGGGTATCAG	(8)	CCACCTCCAAATCCTGAC	(1 6)
3	dJ369D13	dJ369D13-T7	CGGCCTTAAATCTGATA	(1 9)	CTCAATACTGGATCTGTG	(2 0)
	dJ142A6	dJ142A6-SP6	AGTATGGCAGACTTGATG	(1 0)	ATGAATGGGACAAACTTC	(1 4)
		dJ142A6-T7	CTGGGCAAGCTAATTTTG	(2 3)	TCTGGACGTACTCTGTTC	(3 5)
	dJ345P21	dJ345P21-T7	CCCTCACCCACACTTCAC	(1 7)	TTTCCTGCGTGTGGCCTC	(4 0)

3rd

コンティグ	PACクローン	プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3'	(配列番号)	シーケンス(R) 5'-3'	(配列番号)
1	dJ587C9	dJ587C9-T7	ATATTGCAGACTGAACAG	(1 2)	AAGCAGTTTTCCCCATAA	(3)

【 0 0 5 5 】

前記 1 s t スクリーニングにより得られた合計 1 8 クローンは NB-1 及び M A S S - N B - S C H - 1 の 2 株において欠失した領域のゲノムシーケンスを保持していると考えられ、複数のプライマーセットにより検出されるものがあることから、おおまかなコンティグを 3 つ形成した（それぞれをコンティグ 1、コンティグ 2、コンティグ 3 とする）。1 s t スクリーニングによって得られた 1 8 の P A C クローンのコンティグを図 4 に示す。

## 【0 0 5 2】

コンティグ 1 から d J 9 9 E 2 3、d J 3 7 1 E 1 の 2 クローン、コンティグ 2 から d J 3 2 6 J 1 0、d J 7 3 9 D 1 8、d J 7 5 6 A 1 7、d J 3 7 3 D 2 4 の 4 クローン、コンティグ 3 から d J 3 6 9 D 1 3、d J 1 4 2 A 6、d J 3 4 5 P 2 1 の 3 クローン、合計 9 クローンの P A C について両末端の塩基配列を R P N 2 4 3 4（キット：アマシャム社製）を用いて以下の方法により決定した。2  $\mu$  g の P A C D N A、6 p m o l の S P 6 または T 7 プライマー、2  $\mu$  l の A、C、G、T の各試薬の混合液（キット付属品）に滅菌蒸留水を加えてトータル 6  $\mu$  l の混合液を調整する。この混合液を 9 5  $^{\circ}$ C で 2 分間変性させた後、9 5  $^{\circ}$ C で 3 0 秒間、5 0  $^{\circ}$ C で 3 0 秒間、7 2  $^{\circ}$ C で 1 分間を 1 サイクルとして 3 0 サイクル繰り返し P C R 反応を行った。反応液に 5  $\mu$  l の反応停止液（キット付属品）を加え、さらに 9 5  $^{\circ}$ C で 2 分間変性させ氷冷し、6 % のアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、シーケンスを決定した。得られたシーケンス情報から新たにウォーキングプライマーを 1 0 セット設計した。

## 【0 0 5 3】

表 4 に選抜したクローンとそれぞれのプライマーセットの塩基配列を示した。

## 【0 0 5 4】

【表 3】

表 3 : 1stスクリーニングにより得られた 1 8 個のPACクローンとそのコンティグ  
太字は複数のプライマーにより検出されたクローン

プライマーセット	得られたPACクローン	コンティグ
SGC-30343	dJ99E23, dJ371E1, dJ310M20	1
D1S2021	dJ326J10, dJ694C14, dJ736L20, dJ739D18, dJ739F17, dJ756A17	2
D1S1768	dJ266I16, dJ326J10, dJ373D24	
PGD	dJ92K14, dJ266I16, dJ373D24, dJ585H7, dJ686A20	
D1S244	dJ142A6, dJ332G17, dJ345P21, dJ369D13	3
D1S2736	dJ142A6, dJ345P21, dJ369D13	

【 0 0 5 1】



その結果を図3に示す。dJ142A6、dJ332G17、dJ345P21、dJ369D13の4つのPACクローンにおいて、285～296塩基付近に増幅されるバンドが観察された。(図3にはdJ142A6、dJ332G17、dJ369D13のみの結果を示す。)

同様にして、1p36.23-31領域の欠失を確認した他のプライマーセットSHGC-31453、SGC-30343、D1S2021、D1S1768、PGD、D1S2736によるスクリーニングを行った結果、SHGC-31453を除く5つのプライマーセットで増幅が観察されたものが14クローン単離された。

【0049】

以上により得られたクローンを1stスクリーニングとした。1stスクリーニングにより得られた18クローンを表3に示す。

【0050】

検出されたが、1 p 3 6. 2 3 - 3 1 領域内で増幅が予想されるバンドが観察されなかった。

## 【0043】

以上の結果から、ヒト神経芽細胞腫株であるNB-1及びMASS-NB-SC H-1は1 p 3 6部位の少なくともSGC-30343からD1S2736で規定される領域に両染色体の欠失を有するものと判断された。

## 【0044】

(実施例5) 欠失領域のシーケンスを含むPACクローンの選択

実施例3で1 p 3 6. 2 3 - 3 1 領域の欠失が確認されたプライマーセットD1S244を用いて、ヒトゲノムをランダムに有するPACクローン (P1-derived artificial chromosome: オリゴサービスつくば研究所製) をLA PCR kit (宝酒造社製) を用いて以下の方法でPCRを行い、欠失領域のシーケンスを含むPACクローンの選択を行った。

## 【0045】

5  $\mu$  l のPAC DNA pool 溶液 (Z1~Z4: オリゴサービスつくば研究所製)、2  $\mu$  l の10xLA PCR buffer、2.5  $\mu$  l のdNT Ps (2 mM)、0.4  $\mu$  l のD1S244F (100 pmole/ $\mu$  l)、0.4  $\mu$  l のD1S244R (100 pmole/ $\mu$  l)、9.6  $\mu$  l の滅菌蒸留水、および0.1  $\mu$  l のLA taq (5 u/ $\mu$  l) を混合し20  $\mu$  l の混合液を調整した。

## 【0046】

混合液を94℃で3分間変性させた後、94℃で30秒間、56℃で30秒間、72℃で1分間を1サイクルとして35サイクル繰り返しさらに72℃で5分間放置しPCR反応を行った。

## 【0047】

このPCR反応物を電気泳動し、285~296塩基付近に増幅されるバンドが観察されたPAC DNA pool についてののみ同様の方法でさらに2度PCRを行いクローンの絞り込みを行った。

## 【0048】

【表 2】

表 2: SHGC-31453、SGC-30343、D1S2021、D1S1768、PGD、D1S2736 のシーケンス

プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3' (配列番号)	シーケンス(R) 5'-3' (配列番号)	増幅サイズ
SHGC-31453	AAACCTCAGCAGTGGTCTG(2)	AAACCCCTCTTCTTAGAGTGACG(1)	129bp 付近
SGC-30343	GTGTTGGAGGCCAAATGTG(32)	TTGACCGTGTTTGTCACTTAAA(39)	131bp 付近
D1S2021	GTGAAGAGCCAGAGATGTCC(30)	CATAGTGCCACACGCAAG(15)	190bp 付近
D1S1768	ATCTGATGTTTGGAGCTTGAG(13)	ACTAACAGCTCCGTGACGC(5)	147bp 付近
PGD	TTCCAGTTGATCAGAGTGCG(38)	ACCAGGAGCTGCTCATGTG(4)	131bp 付近
D1S2736	CCTCCAGGGTATTCTTGG(18)	TTTTTGAGGTGTGAGAGCAG(42)	130bp 付近

【0 0 4 2】

この結果 (図 2)、陽性対照である h N G F  $\beta$  では増幅が予想されるバンドは

増幅されたバンドが観察される。また本発明により特定された 1 p 3 6. 2 3 - 3 1 領域内に欠失が存在する場合、D 1 S 5 4 8 によって 1 6 9 塩基付近のバンドは観察されるが、D 1 S 2 4 4 によって 2 8 5 - 2 9 6 塩基付近で増幅されたバンドは観察されない。

## 【0038】

前記混合液を 9 6 °C で 3 分間変性させたあと、9 4 °C で 3 0 秒間、5 6 °C で 4 5 秒間、7 2 °C で 1 分間を 1 サイクルとして 3 0 サイクル繰り返し、最後に 7 2 °C で 1 0 分間インキュベートして P C R 反応を行った。得られた P C R 反応物を 4 % のアガロースゲルを用いて電気泳動した。得られた結果を図 1 に示す。

## 【0039】

陽性コントロールのプライマーセットである D 1 S 5 4 8 によって増幅される 1 6 9 塩基付近のバンドは全ての細胞株で観察された。それに対して D 1 S 2 4 4 によって増幅される 2 8 5 ~ 2 9 6 塩基付近のバンドは N B - 1 及び M A S S - N B - S C H - 1 株においてのみ観察されなかった。

## 【0040】

## (実施例 4)

そこで N B - 1 及び M A S S - N B - S C H - 1 の 2 株において 1 p 3 6. 2 3 - 3 1 領域内を特異的に増幅することが知られている他の 5 つのプライマーセット S G C - 3 0 3 4 3、D 1 S 2 0 2 1、D 1 S 1 7 6 8、P G D、D 1 S 2 7 3 6 についてもそれぞれ P C R を行った。陽性対照としてヒト 1 番染色体短腕 1 3 部位 (1 p 1 3) に位置するヒト神経成長因子 (h u m a n N e r v e G r o t h F a c t o r  $\beta$ : h N G F  $\beta$ ) を 2 種類用いた。h N G F  $\beta$  6 0 s はアニーリング温度が 6 0 °C 付近、h N G F  $\beta$  5 7 s はアニーリング温度が 5 7 °C 付近のプライマーで、それぞれ 2 5 3 b p、2 2 9 b p 付近にバンドが増幅される。これらのプライマーの塩基配列を表 2 に示す。

## 【0041】

【表 1】

表 1 : D1S548及びD1S244のシーケンス

プライマーセット	シーケンス(F) 5'-3'	(配列番号)	シーケンス(R) 5'-3'	(配列番号)	染色体の位置	増幅サイズ
D1S548	GAAGTCAATTGGCAAAAGGAA	(25)	GCCTCTTTGTTGCAGTGATT	(28)	1p36.23-31	167bp付近
D1S244	GAGCAGCACCGTACAAAT	(26)	AGTCCGCTCCCTGTAAT	(7)	1p36.23-31	285-296bp付近

【0036】

D1S548はD1S244より1.3Mb染色体のテロメア側を増幅する。  
F及びRはプライマーの方向を示している。

【0037】

ここで、1p36.23-31領域内に全く欠失が存在しない場合、D1S548によって169塩基付近、D1S244によって285～296塩基付近に

260nmの紫外光の吸収により精製したゲノムDNAを定量した。

【0032】

(実施例3) ヒト神経芽腫細胞ゲノムDNAを用いた1p36部位特異的による

欠失株の同定

実験例1、2で抽出、精製した27種類のヒト神経芽細胞腫由来細胞のゲノムDNAを用いて1p36部位の欠失を以下に示すような部位特異的PCRにより同定した。また、使用したPCRプライマーは特に記載されない限り、サウディーテクノロジー社製のものをを用いた。

【0033】

1 $\mu$ lのゲノムDNA溶液(2ng/ $\mu$ l)、1 $\mu$ lの10xPfu buffer、1 $\mu$ lのdNTPs(2mM)、0.2 $\mu$ lのD1S548F(20pmole/ $\mu$ l)、0.2 $\mu$ lのD1S548R(20pmole/ $\mu$ l)、0.2 $\mu$ lのD1S244F(20pmole/ $\mu$ l)、0.2 $\mu$ lのD1S244R(20pmole/ $\mu$ l)、6.12 $\mu$ lの滅菌蒸留水、および0.08 $\mu$ lのPfuを混合し10 $\mu$ lの混合液を調整した。

【0034】

ここでD1S548およびD1S244はともに1p36.23-31領域内を特異的に増幅することが可能な既知のプライマーセットであり、塩基配列を表1に示す。

【0035】

で10分遠心して上清を回収した。さらにもう一度3,000rpmで10分遠心して上清を回収した。

## 【0026】

回収した上清に5.1mlのクロロホルム：イソアミルアルコール=24：1を加えて1時間混和したあと、3,000rpmで10分遠心して上清を回収した。

## 【0027】

回収した上清にあらかじめ-20℃で保冷した10.2mlのエタノールを加えて混和し、得られる糸状のDNAをパスツールピペットでとり、余分のエタノールを取り除いて乾燥させた。乾燥させたDNAに適量のTE buffer (Tris-Cl (pH8.0)、1mM EDTA)を加え、室温で1~2日混和してDNAを溶解した。

## 【0028】

(実施例2) ヒト神経芽腫細胞株から抽出したゲノムDNAの精製

ヒト神経芽腫細胞株から抽出したゲノムDNAをQIA amp Blood kit (QIAGEN社製)を用いて以下に示す条件で精製した。

## 【0029】

抽出したゲノムDNAを260nmの紫外光の吸収により定着し、5~10μgのDNAに適量のTE bufferを加え225μlとした。さらにエタノールを210μl加え攪拌した。

## 【0030】

攪拌液を付属のQIA amp カラム (キット付属品、QIAGEN社製)に移し8000rpmで1分間遠心しゲノムDNAをカラムに吸着させた。カラムに500μlのBuffer AW (キット付属品、QIAGEN社製)を加えて8000rpmで1分間遠心した。さらにbuffer AWをいれて1500rpmで3分間遠心したあと、カラムを1.5mlの新しいチューブへ移し、あらかじめ70℃に暖めておいたbuffer AEを200μl加え、室温で1分間放置後、8000rpmで1分間遠心しDNAを精製した。

## 【0031】

樹立された日本で最も古い神経芽細胞腫細胞株うちのひとつと言われている)

CHP134:Garrett M Brodeurより供与

KCN:Garrett M Brodeurより供与

NBL-S:Garrett M Brodeurより供与

CHP901:患者の手術摘出標本から細胞株樹立した

SY5Y:Garrett M Brodeurより供与

GANB:患者の手術摘出標本から細胞株樹立した

SK-N-AS (ATCC Number:CRL-2137)

KAN:Garrett M Brodeurより供与

LHN:Garrett M Brodeurより供与

SAN:Garrett M Brodeurより供与

TGW:Garrett M Brodeurより供与

MASS-NB-SCH-1:静岡県立こども病院臨床病理科の平岩久幸先生より供与。Cancer 79, 2036-2044 (1997)

KP-N-NB:京都府立医科大学小児科の松村隆文先生より供与

NB69 (理研細胞バンク:RC0480)

NBTu-1:日赤医療センター小児外科の横森欣次先生より供与

SK-N-MC (ATCC Number:HTB-10)

SK-N-SH (ATCC Number:HTB-11)。

#### 【0024】

得られたコンフルエントの培養皿2枚を用いてトリプシン処理により細胞を摂取した。摂取した細胞を5mlのTEN buffer (TEN:50mM Tris-Cl (pH8.0)、1mM EDTA、100mM NaCl)中に懸濁しホモジナイズした。ホモジナイズした懸濁液に750 $\mu$ lのSDS (10%)と125 $\mu$ lのproteinase K (MERCK社製、20mg/ml)を加え、緩やかに転倒混和し、50℃で一晩インキュベートして細胞を溶解させた。

#### 【0025】

翌日、5.1mlの飽和フェノールを加え、1時間混和し10,000rpm



可能である。

### (3) 腫瘍病体メカニズムの解析方法

本発明により開示された塩基配列をもちいて 1 p 3 6 ホモ接合性欠失あるいはヘテロ接合性の消失を有する細胞を見だし、腫瘍病体メカニズムの解析する事が可能である。これら細胞と正常細胞の蛋白質を抽出し、例えばウエスタンブロッティングにより正常細胞でのみ発現している蛋白質を同定することが可能である。その蛋白質を用いて例えばアフィニティークロマトグラフィーにより特異的に相互作用する別の蛋白質の同定も可能である。これらの手法を繰り返すことにより発癌に関する蛋白質の同定しその細胞内における機能を解析することで腫瘍病体メカニズムの解析が可能である。

#### 【0022】

以下、本発明により見いだされた神経芽細胞腫に共通の 1 p 3 6 のホモ接合性欠失領域についての実施例を即してさらに詳しく説明する。

#### 【0023】

##### 【実施例】

##### (実施例 1) ヒト神経芽細胞腫からのゲノム DNA の抽出

以下のヒト神経芽細胞腫由来の細胞株をそれぞれ 10 cm の培養皿でほぼコンフルエントになるように培養した。ここで使用した各細胞名とその入手方法を以下にまとめた。

SK-N-BE (ATCC Number: CRL-2271)

SK-N-DZ (ATCC Number: CRL-2149)

RT-BM1

NLF: Garrett M Brodeur より供与

LA-N-5: (理研細胞バンク: RC0485)

IMR32: Garrett M Brodeur より供与

NMB: Garrett M Brodeur より供与

OAN: Garrett M Brodeur より供与

NGP: Garrett M Brodeur より供与

NB1: 京都府立医科大学小児科の松村隆文先生より供与 (新潟大学脳研究所で

等で標識される。すなわち試料細胞中にプローブ配列とハイブリダイズする核酸が存在しない場合、腫瘍発症の可能性が高く、既に腫瘍を発症している検体では予後が不良であると診断することが可能である。ハイブリダイズさせる方法としては例えば、サザンブロッティング、ノザンブロッティング、ドットブロッティング、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法などが使用できる。

## 【0019】

欠失領域の有無を調べるには、他にも1p36ホモ接合性欠失領域の任意の配列をプライマーとしてPolymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いることにより可能である。

## 【0020】

ヘテロ接合性の消失 (Loss of Heterozygosity: LOH) を同定するには、例えばRestriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法を用いることにより可能である。

## 【0021】

このような方法は当事者にとって周知の方法によって行われる。(例えばMolecular Cloning A LABORATORY MANUAL (T. Maniatis 著: Cold Spring Harbor Laboratory Press 社)、遺伝子病入門 (高久史麿 著: 南江堂) を参照のこと。)

## (2) 抗癌剤の開発

本発明により開示された塩基配列をもちいて1p36ホモ接合性欠失あるいはヘテロ接合性の消失を有する細胞を見だし、抗癌剤のスクリーニングが可能である。これらの細胞は癌化しているため、細胞の分裂増殖が正常細胞に比較して早い。細胞の培養液中に抗癌剤の候補物質を添加し細胞の分裂増殖速度を観察することで1p36ホモ接合性欠失あるいはヘテロ接合性の消失を有する腫瘍の抗癌剤がスクリーニングできる。細胞の分裂増殖速度は例えば、ラジオアイソトープ (例えばトリチウム) ラベルしたチミジンの取り込み量を測定することにより

唱した“two-hit theory”(Kundson A. G., *Pediatr Res* 10, 513-(1976))によると、遺伝子の不活性は母方、父方の2つのコピーが両方とも不活性化した場合にのみ観察されることとなるが、このメカニズムでもっともよく観察されるのが前記LOHである。ここでLOHとは、一方のコピーに小さな遺伝子異常(塩基、遺伝子の一部の欠失や置換)が存在し、もう一方のコピーが存在する染色体はその遺伝子を含んだ大きな領域がそっくり欠失するパターンを意味する。従って、癌抑制遺伝子の不活性化により癌が発症した患者では、癌抑制遺伝子が存在する染色体が正常細胞では2コピー、腫瘍細胞では1コピーになっていると考えられている。

#### 【0016】

しかし通常観察される前記LOHの範囲は、分子遺伝子学的距離としてはきわめて長大で、その中に含まれる遺伝子の数及び塩基数は非常に膨大である。実際現在1p36の欠失領域は、LOHの解析により1p36.2-1p36.3の約8~10Mbに狭められてはいるが、さらに領域の絞り込みが必要である。

#### 【0017】

そこで、本発明者らは、癌抑制遺伝子の同定のために、多くの腫瘍患者の細胞を集め、該患者間のLOHの共通した欠失領域を探索し、約700kbに絞り込んだ。

#### 【0018】

(ヒト神経芽細胞腫1p36ホモ接合性欠失領域に関する応用例)

(1) 腫瘍の遺伝子診断、予後同定の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカー

本発明により開示された塩基配列をもちいて試料細胞中の1p36ホモ接合性欠失領域の有無を調べることにより、腫瘍の診断、予後同定が可能である。欠失領域の有無を調べるには、例えば1p36ホモ接合性欠失領域の任意の配列とハイブリダイズし得る塩基配列(プローブ)を使用する全ての方法が提供される。これらのプローブは、必要に応じてラジオアイソトープ、酵素(例えばアルカリフォスファターゼ、ペルオキシターゼ)、蛍光化合物(例えばフルオレセイン)、あるいは化学発光化合物(例えばアクリジニウムエステル、イソルミノール)

## 【0012】

また、さらに詳しくは前記ヒト細胞芽細胞種の細胞株NB-1及びMASS-NB-SCH-1株で欠失していることを特徴とする領域にかかるものである。

## 【0013】

また、本発明は、前記領域から得られる塩基配列情報に基づいて、腫瘍マーカー、腫瘍の診断試薬、腫瘍の予後同定試薬、抗癌剤を含むものである。

さらに、本発明は、前記領域の塩基配列情報に基づいて、腫瘍病体メカニズムの解析方法、腫瘍病体メカニズムの解析試薬を含むものである。

## 【0014】

## 【発明の実施の形態】

(1p36における新規ホモ接合性欠失領域)

本発明者等は、(1)ヒト1p36(1番染色体短腕36領域)には少なくとも14種類のヒト腫瘍において複数個のがん抑制遺伝子が存在することが予測され、この領域に欠失は神経芽細胞腫の予後の不良さと高い相関を示すこと(Schwab M. 等、Genes Chromosomes Cancer 16, 211-229(1996)、Fong C. T. 等、Cancer Res. 52, 1780-1785(1992))に注目し、また、大腸癌において正常1p36を導入することで癌細胞の正常化が認められること(Tanaka K. 等、Oncogene 8, 2253-2258(1993))、肝癌や大腸癌において1p36の欠失は癌の初期段階から認められること(Kuroki T. 等、Genes Chromosomes Cancer 13, 163-167(1995))に注目し、1p36の欠失が正常細胞の癌化の初期に関与する可能性が高いと考えた。

## 【0015】

さらに、癌抑制遺伝子の同定はヘテロ接合性の喪失(Loss Of Heterozygosity: 以下LOHとする)の解析により可能である。すなわち性染色体を除くヒト細胞の染色体は全て対になって存在し、遺伝子も母方からと父方からの2つのコピーが存在する。ここでKundson A. G. 等が提

そのために使用可能な腫瘍マーカーを提供することを目的とするものである。

また、該塩基配列情報に基づき、遺伝子診断方法、抗癌剤の開発、腫瘍病体メカニズムの解析方法、腫瘍病体メカニズムの解析に用いる試薬の開発を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、神経芽細胞腫の癌抑制遺伝子を見いだすべく鋭意研究した結果、ヒト神経芽細胞腫の細胞株であるNB-1の第1番染色体短腕36位（以下1p36とする）において、新規なホモ接合性欠失（Homozygous Deletion）領域を見いだした。

【0008】

かかる知見に基づき、腫瘍の診断、予後同定の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカーを設計することを可能とし本発明を完成した。さらに、該領域の塩基配列情報に基づき、腫瘍の遺伝子診断方法、抗癌剤の開発、腫瘍病体メカニズムの解析方法、腫瘍病体メカニズムの解析に用いる試薬の開発を可能とし本発明を完成した。

【0009】

より詳しくは、本発明は、ヒト神経芽細胞腫の第1番染色体短腕36位（以下1p36とする）に共通に存在するホモ接合性欠失（Homozygous Deletion）領域にかかるものである。

【0010】

より詳しくは、前記領域が、少なくともPACクローンであるdJ1028013のSP6側プライマーセットとPACクローンであるdJ371E1のSP6側プライマーセットの間から、プライマーセットD1S2736とPACクローンであるdJ142A6のT7側プライマーセットの間で規定されることを特徴とする領域にかかるものである。

【0011】

また、さらに前記領域が、さらに少なくともプライマーセットSGC30343およびD1S2736で規定されることを特徴とする領域にかかるものである。

R B 遺伝子は小児の眼の癌である網膜芽細胞腫 (R e t i n o b l a s t o m a) の原因となる遺伝子として発見されたためこの名が付けられた。網膜芽細胞腫ではヒト第 13 染色体長腕 14 領域 (13 q 14) が短くなっていることが多く (Y u n i s J J. 等 A m. J. D i s. C h i l d. 132, 161-163 (1978))、この部分にある遺伝子が失活すると癌になりやすくなるのではないかとずいぶん前から推定されていた。しかし遺伝子のクローニングは難しく、1986 年になってヒトの癌抑制遺伝子としては初めて R B が同定されるに至った。(F r i e n d S H. 等 N a t u r e 323, 643-646 (1986))

ウィルムス腫瘍 (W i l m s' T u m o r) は小児の後腎造腎組織より発生する胎児性悪性腫瘍で、腎芽腫とも呼ばれる。患者はしばしば泌尿生殖器の異常を伴うが、疫学的データから網膜芽細胞腫と同様に "T w o - h i t - t h e o r y" が適用できるとされ、劣性型の腫瘍遺伝子の関与が推定されていた。腫瘍 (W) と泌尿生殖器 (G) の異常に加えて、無虹彩症 (A) と精神発達遅滞 (R) を伴う W A G R 症候群の患者で第 11 番染色体短腕 13 領域 (11 p 13) に微少な欠失がしばしば認められる。この共通欠失領域に位置する遺伝子として W T 1 が単離された (C a l l K M. 等 C e l l 60, 509-520 (1990))。

#### 【0004】

その後も染色体の欠失領域の情報を元に多くの癌抑制遺伝子が発見されたが、1 p 36 の欠失領域から神経芽細胞腫の癌抑制遺伝子は現在もなお同定されるに至っていない。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヒト神経芽細胞腫に共通に存在する第 1 番染色体短腕 36 位 (以下 1 p 36 とする) の新規なホモ接合性欠失 (H o m o z y g o u s D e l e t i o n) 領域に関する情報を提供することを目的とする。

#### 【0006】

さらに、該領域の塩基配列情報に基づき、腫瘍の診断、予後同定の方法および

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト 1 p 3 6 ホモ接合性欠失領域

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト神経芽細胞腫の第 1 番染色体短腕 3 6 位（以下 1 p 3 6 とする）に共通に存在するホモ接合性欠失（H o m o z y g o u s D e l e t i o n）領域。

【請求項 2】 少なくとも P A C クローンである d J 1 0 2 8 O 1 3 の S P 6 側プライマーセット及び P A C クローンである d J 3 7 1 E 1 の S P 6 側プライマーセットの間から、プライマーセット D 1 S 2 7 3 6 と P A C クローンである d J 1 4 2 A 6 の T 7 側プライマーセットの間で、規定されることを特徴とする請求項 1 に記載の領域。

【請求項 3】 前記領域が、さらに少なくともプライマーセット S G C 3 0 3 4 3 および D 1 S 2 7 3 6 で規定されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の領域。

【請求項 4】 ヒト神経芽細胞腫の細胞株 N B - 1 及び M A S S - N B - S C H - 1 株において欠失していることを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の領域。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト神経芽細胞腫の第 1 番染色体短腕 3 6 位（以下 1 p 3 6 とする）に共通に存在するホモ接合性欠失（H o m o z y g o u s D e l e t i o n）領域に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

発癌に関与している癌関連遺伝子には、不活性化されて発癌を促す癌抑制遺伝子が存在することが知られており、例えば R B または W T - 1 という癌抑制遺伝子がすでに見いだされ同定されている。

【 0 0 0 3 】

特平 1 1 - 2 4 5 9 6 2

【物件名】	要約書	1
【ブルーフの要否】	要	



【書類名】 特許願

【整理番号】 HMS785

【提出日】 平成11年 8月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 6 6 2 番 2 号 医師住宅 2  
0 3

【氏名】 中川原 章

【特許出願人】

【識別番号】 000160522

【氏名又は名称】 久光製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 592077671

【氏名又は名称】 千葉県

【代理人】

【識別番号】 100088155

【弁理士】

【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100107191

【弁理士】

【氏名又は名称】 長濱 範明

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014708

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

31.08.00

REC'D 20 OCT 2000

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。 8/3

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 8月31日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第245962号

出 願 人

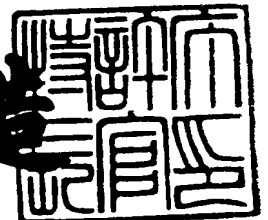
Applicant (s):

久光製薬株式会社  
千葉県PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月 6日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3080798